最 終 報 告 書

1,3,5-トリス（2-ヒドロキシエチル）-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンの
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：4178（ 115－096 ）

平成12年7月13日

試験委託者
厚生省　生活衛生局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目次

1. 要約 3
2. 表題 4
3. 試験目的 4

11. 被験物質 6
12. 試験材料および方法 8
13. 試験結果 16
14. 考察および結論 17
15. 参考文献 18

Figures F-1~5
Figure 1 Dose-survival curves of 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [short-term treatment] F-1
Figure 2 Dose-survival curve of 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [continuously treatment] F-2
Figure 3 Incidence of structural aberrations induced by 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [short-term treatment：-S9] F-3
Figure 4 Incidence of structural aberrations induced by 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [short-term treatment：+S9] F-4
Figure 5 Incidence of structural aberrations induced by 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [continuously treatment：24 hrs] F-5

Tables		T-1~5
Table 1	Results of growth inhibition test on 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [short-term treatment]	T-1
Table 2	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [short-term treatment : -S9]	T-2
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [short-term treatment : +S9]	T-3
Table 4	Results of growth inhibition test on 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [continuously treatment]	T-4
Table 5	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [continuously treatment : 24 hrs]	T-5

1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において，1,3,5-トリス（2-ヒドロキシエチル）-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンは染色体異常を誘起しないものと判断した.

1,3,5-トリス（2-ヒドロキシエチル）-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンの変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため，チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株（CHL）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った.
あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に，試験用量を設定した．染色体異常試験では短時間処理法-S9 ならびに+S9 処理とも 10 mM 相当の濃度を含む 653，1306 および 2612 μg/mL の 3 用量について顕微鏡観察を実施した.
その結果，1,3,5-トリス（2-ヒドロキシエチル）-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオン処理群では-S9 ならびに+S9 処理の各用量群とも明確な染色体異常の誘発は認められなかった．従って，653，1306 および 2612 μg/mL の 3 用量を用いた連続処理法 24 時間処理での染色体異常試験を実施した．その結果，被験物質処理群では染色体異常の誘発は認められなかった.
また，短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の陽性対照物質マイトマイシン C（MMC）ならびに短時間処理法+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド（CP）は，いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した.

2. 表題

1,3,5-トリス（2-ヒドロキシエチル）-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討した.

11. 被験物質

11.1. 被験物質名

1,3,5-トリス（2-ヒドロキシエチル）-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオン

【1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-】

11.2. ロット番号

11.3. 純度

99.0 wt%

11.4. 保管条件

冷暗所

11.5. 別名

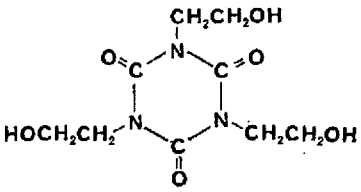
タナック

トリス（2-ヒドロキシエチル）イソシアヌレート

11.6. CAS番号

839-90-7

11.7. 構造式又は示性式



11.8. 分子量

261.24

11.9. 不純物の名称

イソシアヌル酸

11.10. 常温における性状

白色粉末

11.11. 融点

135℃

11.12. 沸点

180℃，3 mmHg で分解

11.13. 溶媒に対する溶解度等

水：120 g/100 g（25℃）
アセトン：1.9 g/100 g（25℃）
メタノール：20 g/100 g（25℃）

11.14. 安定性

水，光に対して安定．分解温度 296℃

11.15. 取り扱い上の注意

接触，吸入を防止するために長袖着，保護具を着用する．火気に近づけない．

11.16. 残余被験物質の処理

被験物質の残余は，被験物質提供元に返却した．

12. 試験材料および方法

12.1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから，試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株（CHL 細胞）を選択した．CHL 細胞は昭和 59 年 11 月 15 日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受け，一部についてはジメチルスルホキシド（DMSO：GC 用；Merck KGaA；純度 99.7%以上；Lot No. K23082678 651）を容量比で 10%添加した後，液体窒素中に保存した．試験に際しては凍結細胞を融解し，3～5 日ごとに継代したものを使用した．

なお，染色体異常試験では継代数 9 の細胞を用いた．

12.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（岩城硝子株式会社；Lot No. 99560002）に，メンブランフィルター（孔径 0.45 μm：Featuring Corning and Coastar Products）を用いて濾過除菌した非働化（56℃，30 分）済み仔牛血清（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1014735【予備試験】，1019033【本試験】）を最終濃度で 10%になるよう添加した．調製後の培養液は使用時まで冷暗所（4℃）に保存した．

12.3. 培養条件

CO_2 インキュベーター（Forma および三洋電機メディカシステム株式会社）を用い，CO_2 濃度 5%，37℃の条件で細胞を培養した．

12.4. S9 mix

試製造後6ヵ月以内のS9 mix（キッコーマン株式会社：Lot No. CAM-397）を試験に使用した.

12.4.1. S9の調製方法

調製の際の動物種，性，臓器，誘導物質ならびに誘導方法を以下に示す.

a.	ロット番号	RAA-397
b.	調製日	平成11年2月5日（誘導物質投与開始後5日目）
c.	使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系
d.	性／週齢	雄／7週齢
e.	体重	192～237 g
f.	臓器	肝臓
g.	誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
h.	投与量 および 投与回数	PB:30 mg/kg 1回（1日目） 60 mg/kg 3回（2～4日目） BF:80 mg/kg 1回（3日目）
i.	投与方法	腹腔内投与
j.	蛋白含量	25.4 mg/mL

12.4.2. S9 mixの組成

S9 mix 1 mL中の量を以下に示す.

S9	0.3	mL
KCl	33	μmol
$MgCl_2$	5	μmol
G-6-P	5	μmol
NADP	4	μmol
HEPES 緩衝液	4	μmol

12.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に易溶であり，かつ生理食塩液中で安定であることから，被験物質を日本薬局方生理食塩液（株式会社 大塚製薬工場；Lot No. K8I84）に溶解させ調製原液とした．この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に順次希釈した後，直ちに処理を行った．

12.6. 対照群

12.6.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒のみで試験した．

12.6.2. 陽性対照（短時間処理法）

-S9 処理（代謝活性化法によらない場合）の場合，注射用水（株式会社 大塚製薬工場；Lot No. K8F80）5 mL に溶解したマイトマイシン C（MMC：協和醗酵工業株式会社；Lot No. 247AHK）を生理食塩液（Lot No. K8I84）を用いて希釈した後，0.1 μg/mL の用量で試験した．

+S9 処理（代謝活性化法による場合）の場合，注射用水（Lot No. K8F80）5 mL に溶解したシクロホスファミド（CP：塩野義製薬株式会社；Lot No. 8016）を生理食塩液（Lot No. K8I84）を用いて希釈した後，12.5 μg/mL の用量で試験した．

12.7. 用量設定試験（予備試験）

12.7.1. 試験用量

予備的な試験（8.10，27.0，90.0，300 および 1000 μg/mL の 5 用量：公比 10/3）の結果，-S9 処理（処理後 6 時間時点での観察）あるいは+S9 処理の 1000 μg/mL においても細胞増殖抑制作用は観察されなかった．

本結果を参考に，細胞増殖抑制試験の用量として 10 mM 相当の用量を含む下記に示した 6 用量（公比 5/3）を設定した．

試験	用量数	試験用量 (μg/mL)
短時間処理法-S9 処理	6	203 ～ 2612
短時間処理法+S9 処理	6	203 ～ 2612

12.7.2. 使用ウエル数

1 用量当たり 2 ウエルを用いた．

12.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウエルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F：住友ベークライト株式会社）の各ウエルに培養液を用いて 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し，3 日間培養した．培養終了後，培養液 400 μL を除いた後，使用溶媒（以下溶媒）あるいは被験物質液を 60 μL 加えた．6 時間培養を続けた後，各ウエルの培養液を除去し，ダルベッコリン酸緩衝液（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1020975）を用いて細胞を洗浄した．培養液（500 μL）を新鮮なものに交換し，さらに 18 時間培養を続けた後に細胞生存率（陰性対照に対する比）を求めた．

12.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウエルに 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し，3 日間培養した．培養終了後，培養液 500 μL を除き，S9 mix を 100 μL 添加した後，溶媒あるいは被験物質液を 60 μL 加えた．

以下の操作は 12.7.3. に記載の方法に準じた．

12.7.5. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各プレートから培養液を除き，生理食塩液を用いて細胞を 1 回洗浄した．10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：和光純薬工業株式会社；Lot No. ACG8912）を加えて約 10 分間細胞を固定した後，0.1%クリスタル・バイオレット（関東化学株式会社；Lot No. 607E4067）水溶液で 10 分間染色した．各プレートを水洗した後，十分乾燥させた．各ウエルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を 3.0 mL 加え，5 分間放置した後，580 nm での吸光度を分光光度計（105-50 型；株式会社 日立製作所）を用いて測定した．陰性対照群での吸光度に対する比（＝細胞生存率）を各用量群について求めた．

なお，細胞生存率の平均値は各ウエルの四捨五入する以前の値から求めた．

12.7.6. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1 および Table 1 に示した．

短時間処理法-S9 処理ならびに同+S9 処理の最高用量である 2612 μg/mL（10 mM 相当）においても明確な細胞増殖抑制作用は認められなかった．

なお，被験物質暴露終了時，pH の変動，析出等の特筆すべき変化は，いずれの試験系においても観察されなかった．

12.8. 本試験（染色体異常試験）

12.8.1. 試験用量

細胞増殖抑制試験結果を基に，各試験系それぞれ3用量（公比2：下表参照）を本試験の用量に設定した．

試験	試験用量 (μg/mL)		
短時間処理法-S9 処理	653	1306	2612
短時間処理法+S9 処理	653	1306	2612

12.8.2. 試験プレート数

1用量当たり2枚のプレートを用いた．

12.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート（細胞培養用シャーレ：住友ベークライト株式会社）に 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 5 mL（4×10^4 細胞）を播種し，3日間培養した．培養終了後，培養液 2 mL を除いた後，溶媒，被験物質液あるいは陽性対照物質溶液 300 μL を加えた．6時間培養を続けた後，各プレートの培養液を除去し，ダルベッコリン酸緩衝液（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1020975）を用いて細胞を洗浄した．培養液（3 mL）を新鮮なものに交換し，さらに18時間培養を続けた後に染色体標本を作製した．

12.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し，3日間培養した．培養終了後，培養液 2.5 mL を除き S9 mix を 500 μL 添加した後，溶媒，被験物質液あるいは陽性対照物質溶液 300 μL を加えた．
以下の操作は 12.8.3. に記載の方法に準じた．

12.8.5. 標本の作製

染色体標本作製の2時間前に最終濃度で0.2 μg/mLとなるようコルセミド溶液（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1017694）を添加し，細胞分裂を中期で停止させた．次いで，培養液を遠心管に全量移した後，0.25%トリプシン溶液（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1017538）を用いてプレートから細胞を剥離し，遠心管内の培養液に加えた．細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後，37℃に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え，37℃中で 16 分間低張処理を行った．遠心分離により低張液を除いた後，4℃に冷却した固定液（メタノール 3 容：酢酸 1 容）で細胞を固定した．固定液を 3 回交換した後，新しい固定液を適量加えて細胞浮遊液とし，脱脂洗浄済みのスライドガラス上に 1～2 滴ずつ滴下した．スライド標本を十分乾燥させ，1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 6.8：Merck KGaA；Lot No. S617674 520）を用いて希釈した 1.2%ギムザ染色液（Merck KGaA；Lot No. 640181939）で 12 分間染色した．スライドを軽く水洗した後，乾燥させた．

12.8.6. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に陰性対照，各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて，ATP フォトメーター（ルミテスター K-100：キッコーマン株式会社）を用いて細胞増殖に関するデータを採取した．なお，細胞生存率の平均値は各プレートの四捨五入する以前の値から求めた．

12.8.7. 染色体の観察

各プレート当たり 100 個，すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下（×600）で観察し，染色体の形態的変化としてギャップ（gap），染色分体切断（ctb），染色体切断（csb），染色分体交換（cte），染色体交換（cse）およびその他（oth）の構造異常に分類した．ただし，染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し，染色体切断様の像が認められる場合，その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満，かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した．また，数的異常として 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し，倍数体等の出現数についても計数した．

すべての標本をコード化した後，マスキング法で観察した．

12.9. 連続処理法

短時間処理法において陰性と判定されたことから，以下に示す代謝活性化によらない条件での連続処理法を実施した．

12.9.1. 陽性対照

注射用水（Lot No. K8F80）5 mL に溶解したマイトマイシン C（MMC：Lot No. 247AHK）を生理食塩液（Lot No. K8I84）を用いて希釈した後，0.05 μg/mL の用量で試験した．

12.9.2. 細胞増殖抑制試験（24 時間処理）

予備的な試験（8.10，27.0，90.0，300 および 1000 μg/mL の 5 用量：公比 10/3）の結果，連続処理法 24 時間処理の 1000 μg/mL においても細胞増殖抑制作用は観察されなかった．従って，203～2612 μg/mL の 6 用量（公比 5/3）を試験用量として設定した．1 用量当たり 2 ウエルを用いた．

各ウエルに 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し，3 日間培養した．培養終了後，溶媒または被験物質液を 10 μL 加え，さらに 24 時間培養を続けた．

10％中性緩衝ホルマリン液（Lot No. ACG8912）で細胞を固定した後，0.1％クリスタル・バイオレット（Lot No. 607E4067）水溶液で染色した．各ウエルに色素溶出液を 3.0 mL 加えた後，580 nm での吸光度を測定した．なお，細胞生存率の平均値は各ウエルの四捨五入する以前の値から求めた．

12.9.3. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 2 および Table 4 に示した．

10 mM 相当の 2612 μg/mL においても細胞増殖抑制作用は認められなかった．なお，被験物質暴露終了時，pH の変動，析出等の特筆すべき変化は観察されなかった．

12.9.4. 染色体異常試験（24 時間処理）

細胞増殖抑制試験結果を基に，653，1306 および 2612 μg/mL の 3 用量（公比 2）を処理した後，染色体異常の観察を実施した．1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた．

各プレートに 8×10^5 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し，3 日間培養した．培養終了後，溶媒または被験物質液をあるいは陽性対照物質溶液を 500 μL を加え，さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した．

標本作製 2 時間前に 0.2 μL となるようコルセミド溶液（Lot No. 1017694）を添加した．0.25％トリプシン溶液（Lot No. 1017538）を用いて細胞を剥離し，16 分間低張処理を行なった後，細胞を固定した．スライド標本を作製した後，1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液（Lot No. S617674 520）を用いて希釈した 1.2％ギムザ染色液（Lot No. 640181939）で 12 分間染色した．

12.8.7 に記載した方法に準じて染色体異常の観察を実施した．

12.9.5. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に陰性対照，各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて，ATP フォトメーターを用いて細胞増殖に関するデータを採取した．なお，細胞生存率の平均値は各プレートの四捨五入する以前の値から求めた．

12.10. 結果の解析

最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めない場合について行った．

異常細胞の出現頻度が 5％未満を陰性，5％以上 10％未満，かつ再現性が認められた場合に疑陽性，10％以上，かつ再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合，陽性と判定した．

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった．

13. 試験結果

13.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Table 2 および Appendix 1 に示した.

1,3,5-トリス（2-ヒドロキシエチル）-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオン処理群での染色体構造異常ならびに倍数性細胞の出現頻度は，陰性対照と同等であった．また，被験物質処理による明確な細胞増殖抑制作用は 10 mM 相当の 2612 μg/mL 処理においても認められなかった.

一方，陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され，その出現頻度は 50.0%を示した.

なお，被験物質暴露終了時，pH の変動，析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

13.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Table 3 および Appendix 2 に示した.

1,3,5-トリス（2-ヒドロキシエチル）-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオン処理群での染色体構造異常ならびに倍数性細胞の出現頻度は，陰性対照と同等であった．また，被験物質処理による明確な細胞増殖抑制作用はいずれの用量においても認められなかった.

一方，陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 82.0%であった.

なお，被験物質暴露終了時，pH の変動，析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

13.3. 連続処理法 24 時間処理

短時間処理法の結果が陰性であったことから，連続処理法 24 時間処理の試験を追加して実施した.

試験結果を Table 5 および Appendix 3 に示した.

被験物質処理群での染色体構造異常ならびに倍数性細胞の出現頻度は，陰性対照と同等であった．また，被験物質処理による明確な細胞増殖抑制作用はいずれの用量においても認められなかった.

陽性対照では構造異常細胞が 38.5%出現した.

なお，被験物質暴露終了時，pH の変動，析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

14. 考察および結論

1,3,5-トリス（2-ヒドロキシエチル）-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンの変異原性，すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため，培養細胞（CHL）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した.

細胞増殖抑制試験結果を基に，短時間処理法（-S9 および+S9 処理）において 10 mM 相当の 2612 μg/mL まで検討した.

その結果，1,3,5-トリス（2-ヒドロキシエチル）-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオン処理群では明確な染色体異常の誘発は認められなかった.

従って，連続処理法 24 時間処理による試験を実施したが，同様に染色体異常の誘発は認められなかった.

また，本被験物質の類縁体である 1,3,5-Trichloro-1,3,5-triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trione については Ames 試験で陰性との報告がある [1]. なお，1,3,5-Triethylhexahydro-1,3,5-triazine，Triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trione，ならびに Trichloromelamine の変異原性に関する報告はなかった.

一方，陰性対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも当センターの背景データの範囲内であり，本試験が有効であることを示していた.

以上の試験結果から，本試験条件下において 1,3,5-トリス（2-ヒドロキシエチル）-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した.

15. 参考文献

1) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課　監修:労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 社団法人　日本化学物質安全・情報センター，東京，1996.

Exp. No. 4178 (115-096)

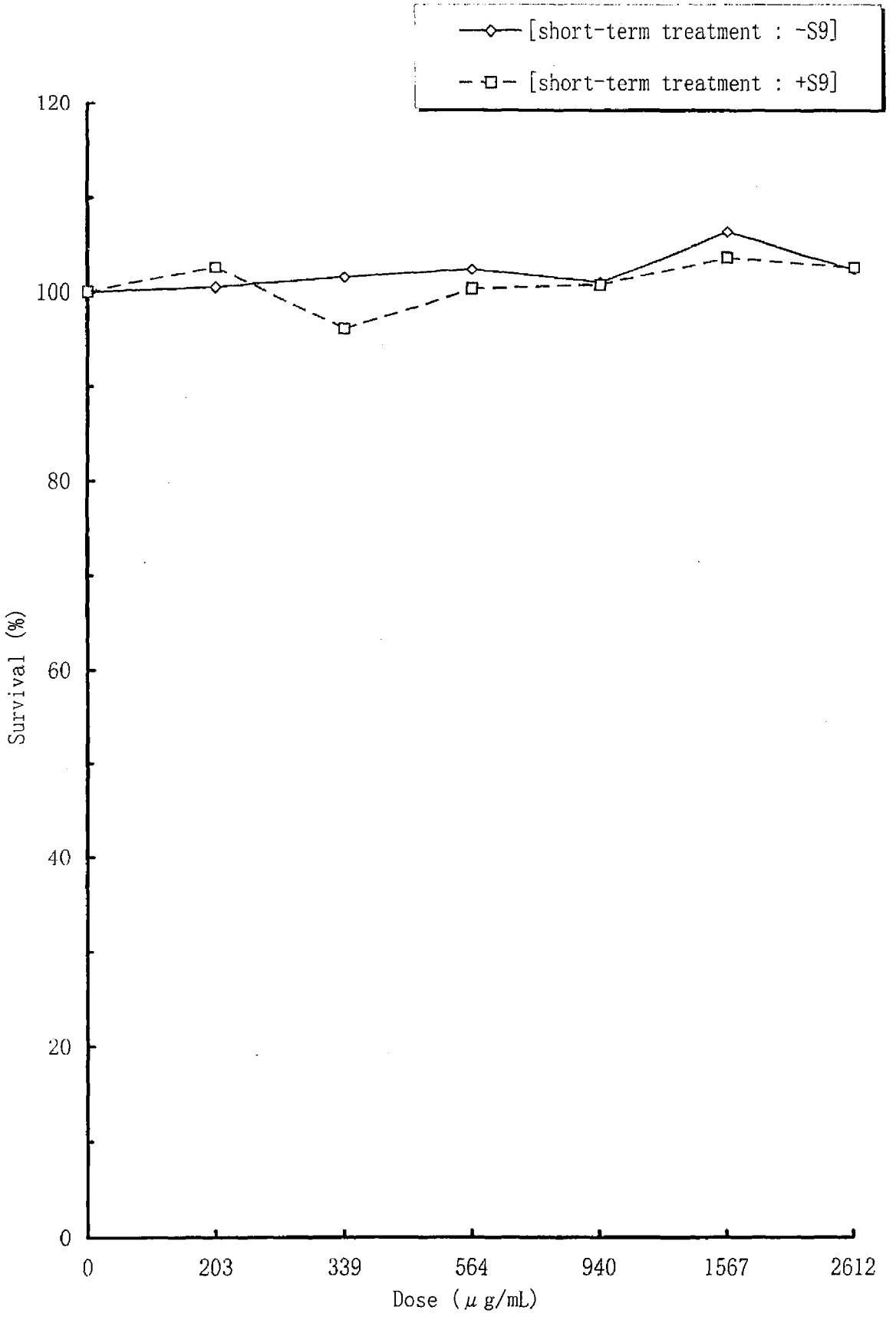


Figure 1. Dose-survival curves of 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [short-term treatment]

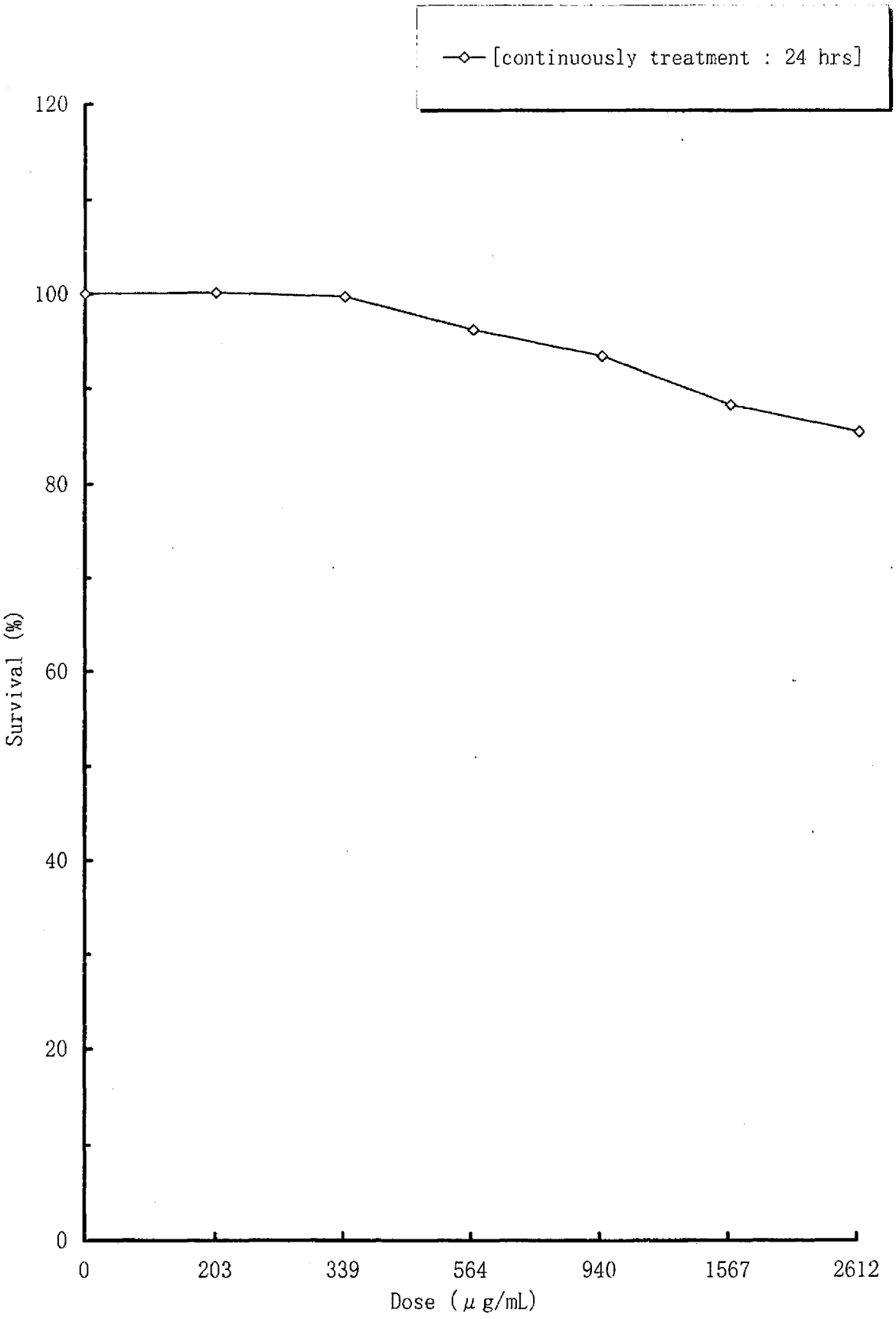


Figure 2. Dose-survival curve of 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [continuously treatment]

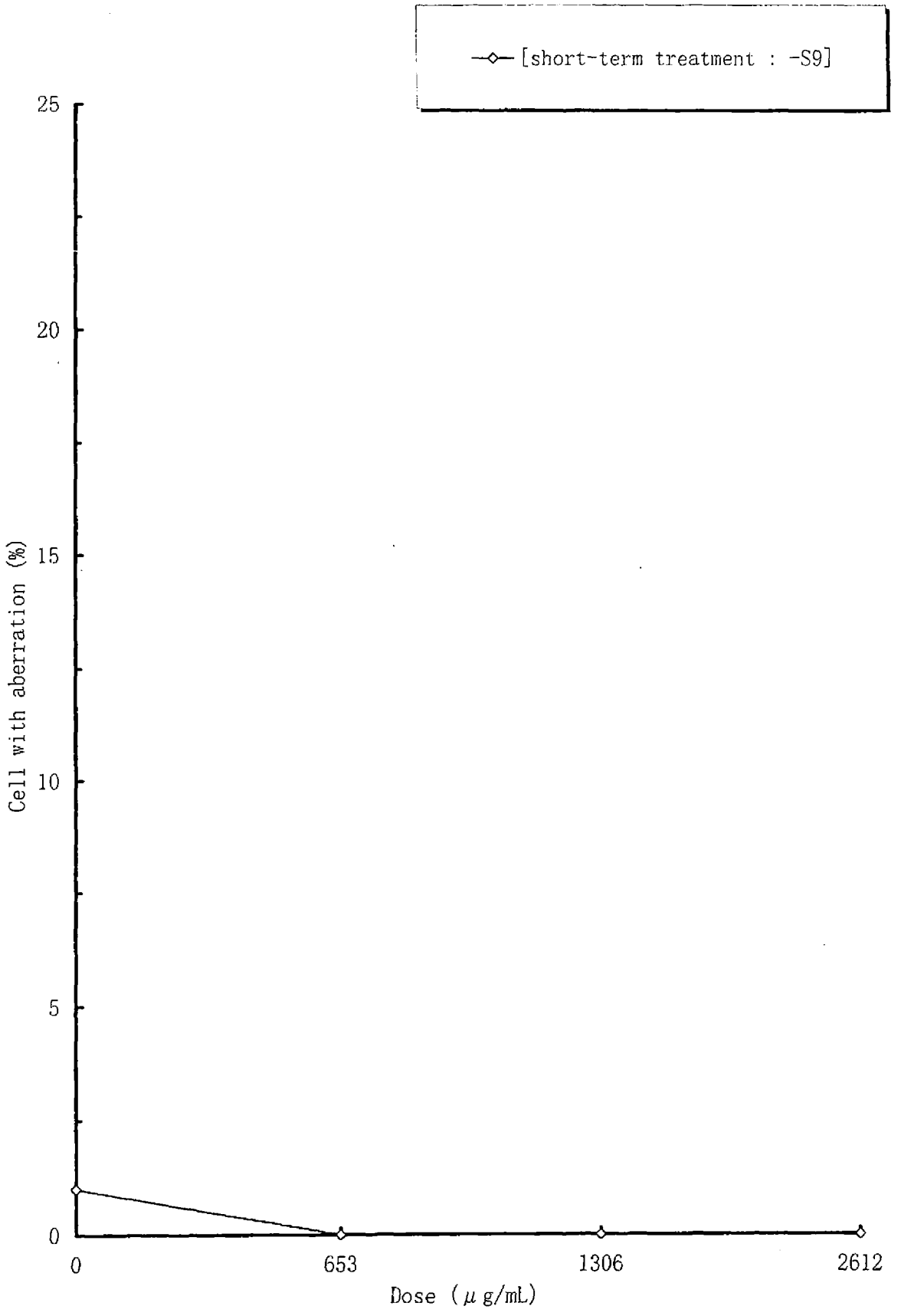


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-
[short-term treatment : -S9]

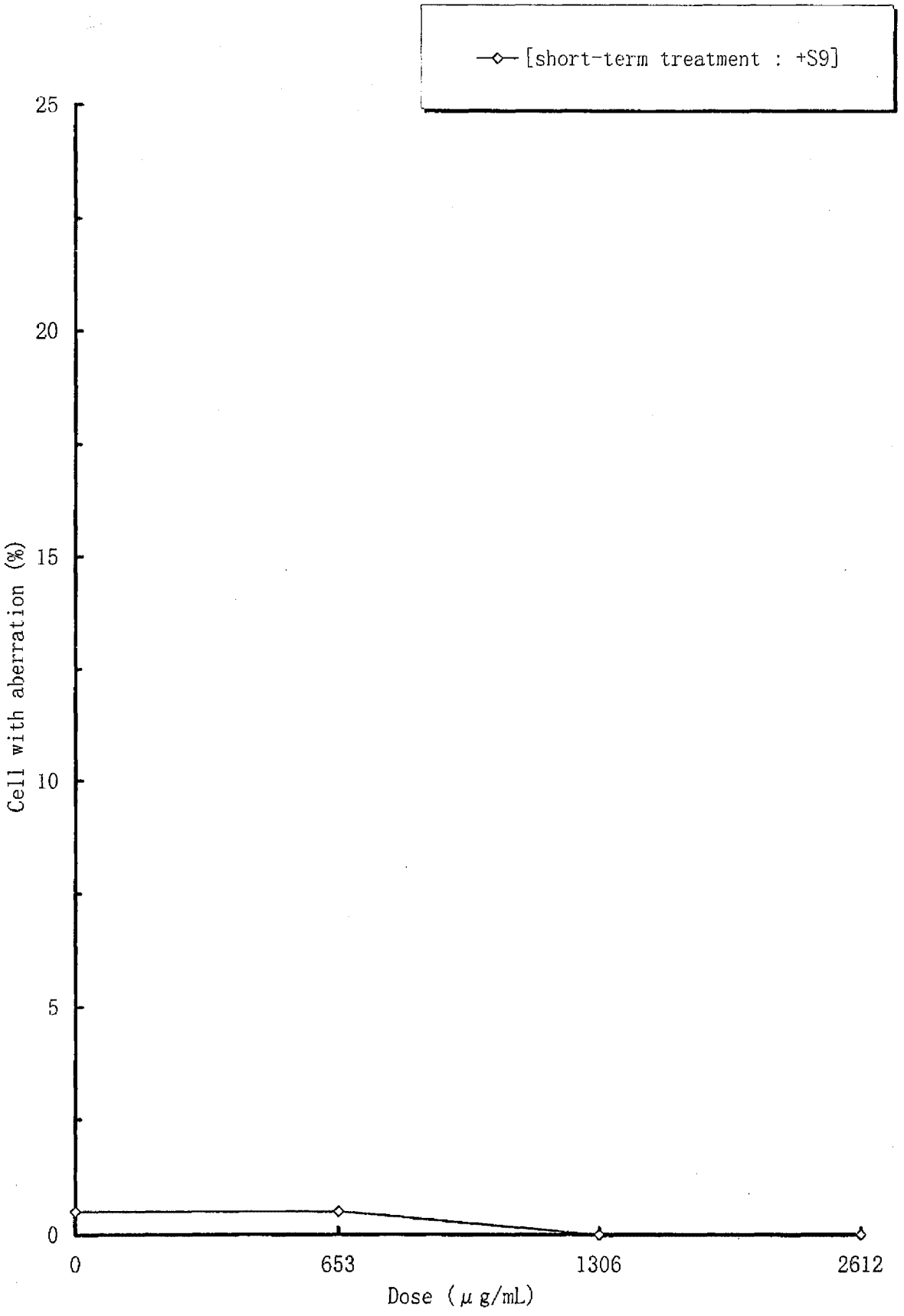


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-
[short-term treatment : +S9]

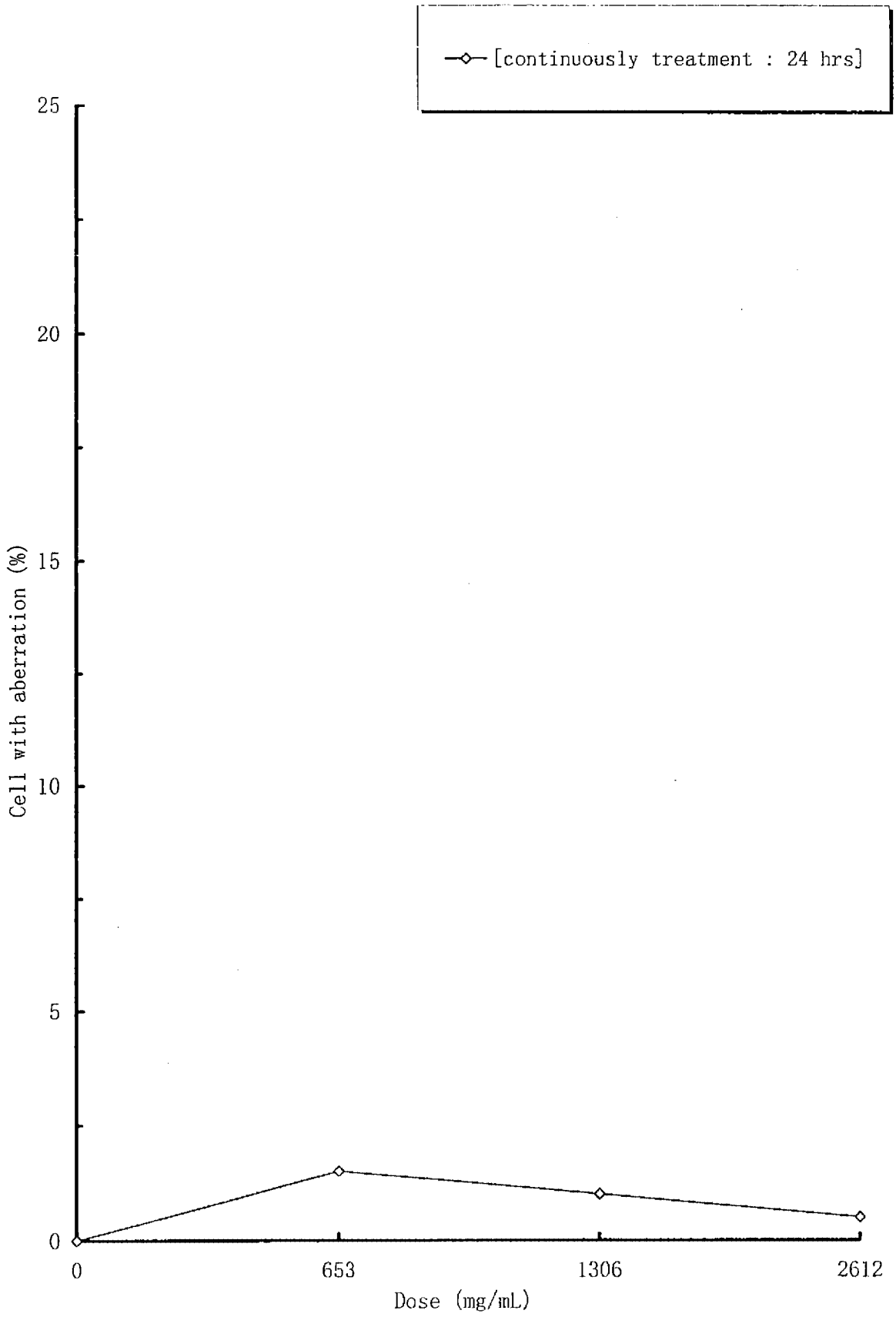


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [continuously treatment : 24 hrs]

Table 1. Results of growth inhibition test on 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [short-term treatment]

[short-term treatment : -S9]				[short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (μg/mL)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose (μg/mL)	Survival (%)	[Mean]
Saline a)	0	100.0 100.0	[100.0]	Saline a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	203	100.7 100.2	[100.5]	Tesr substance	203	102.3 102.9	[102.6]
	339	103.3 99.7	[101.5]		339	95.2 97.0	[96.1]
	564	100.7 104.1	[102.4]		564	101.3 99.4	[100.4]
	940	101.9 100.1	[101.0]		940	101.3 100.2	[100.8]
	1567	106.2 106.5	[106.4]		1567	104.3 103.2	[103.8]
	2612	102.6 102.3	[102.5]		2612	102.4 102.9	[102.7]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[short-term treatment : -S9] ——— Not inhibited
[short-term treatment : +S9] ——— Not inhibited

a): Negative control

Exp. No. 4178 (115-096)

Table 2. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [short-term treatment : -S9]

Compound	Dose (μg/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline a)	0	100.0	200	1	1	1	0	0	0	1.0 −	0.0 −	−
Test substance	653	95.0	200	1	0	0	0	0	0	0.0 −	0.0 −	−
	1306	93.8	200	0	0	0	0	0	0	0.0 −	1.0 −	−
	2612	94.2	200	1	0	0	0	0	0	0.0 −	0.0 −	−
MMC b)	0.1	60.1	200	11	22	87	0	0	0	50.0 +	1.0 −	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Negative control
b): Positive control (Mitomycin C)

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [short-term treatment : +S9]

Compound	Dose (μg/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline a)	0	100.0	200	0	0	0	1	0	0	0.5 −	1.0 −	−
Test substance	653	98.8	200	2	0	1	0	0	0	0.5 −	0.0 −	−
	1306	74.0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 −	0.0 −	−
	2612	72.8	200	0	0	0	0	0	0	0.0 −	0.0 −	−
CP b)	12.5	38.4	200	14	20	160	1	1	0	82.0 +	0.0 −	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Negative control
b): Positive control (Cyclophosphamide)

Exp. No. 4178 (115-096)

Table 4. Results of growth inhibition test on 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [continuously treatment]

[continuously treatment : 24 hrs]			
Compound	Dose (μg/mL)	Survival (%)	[Mean]
Saline a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	203	98.9 101.3	[100.1]
	339	101.5 97.8	[99.7]
	564	97.7 94.6	[96.2]
	940	94.5 92.2	[93.4]
	1567	87.6 88.9	[88.3]
	2612	83.8 86.9	[85.4]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[continuously treatment : 24 hrs] ——— Not inhibited

a): Negative control

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- [continuously treatment : 24 hrs]

Compound	Dose (mg/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline a)	0	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 −	0.0 −	−
Test Substance	653	94.5	200	3	2	0	1	0	0	1.5 −	0.5 −	−
	1306	93.3	200	0	0	1	1	0	0	1.0 −	0.0 −	−
	2612	91.0	200	1	1	0	0	0	0	0.5 −	0.0 −	−
MMC b)	0.05	63.1	200	7	17	66	1	0	0	38.5 +	0.5 −	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Negative control
b): Positive control (Mitomycin C)